

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DER FETTSÄUREN
IN DEN SERUMPHOSPHATIDEN
BEI NEUGEBORENE

Chidebelu L. Eze

ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DER FETTSÄUREN
IN DEN SERUMPHOSPHATIDEN
BEI NEUGEBORENEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Chidebelu L. E z e
aus Umuaga/Nigeria

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.N.ZÖLLNER
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.W.SEITZ
Dekan:	Prof.Dr.R.ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.1966

INHALTSVERZEICHNIS

	Seiten
Einleitung	1 - 2
Methodik:	
Gewinnung des Serums	
Extraktion der Serumlipoide	3
Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipoide	4
Dünnschichtchromatographie	5 - 6
Gesamt-Phosphatid-Bestimmung	7 - 10
Gaschromatographie	10 - 11
Ergebnisse und Diskussion	12 - 14
Zusammenfassung	15
Literaturverzeichnis	16 - 17
Tabellen	
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Popjak hat in zwei Arbeiten über die Synthese der Phosphatide in Foeten⁷⁾ und über den Ursprung der Foetalen Lipide⁶⁾ in Untersuchungen an Kaninchen quantitative Unterschiede der Lipoidfraktionen bei Foeten und erwachsenen Tieren beschrieben.

Analog diesen Besonderheiten foetaler Serumphosphatide beim Kaninchen wurden von Zöllner und Wolfram¹³⁾ durch Untersuchungen der Cholesterinester im Nabelschnurblut auch bei menschlichen Neugeborenen typische vom Serum des Erwachsenen abweichende Verteilungen der mit Cholesterin veresterten Fettsäuren nachgewiesen. Im einzelnen fanden sie nach Dünnschichtchromatographieauftrennung eine deutliche Verminderung der Ester der Dienfettsäuren, d.h. überwiegend der Linolsäure, und eine Vermehrung der Tri- und Tetraenfettsäuren enthaltenen Esterfraktion. Diese Verminderung der Linolsäure, eine essentielle Fettsäure mit Vitamincharakter, läßt zunächst auf einen relativen Mangel an essentiellen Fettsäuren beim Neugeborenen schließen. Beobachtungen von Hansen, Wiese und Mitarbeiter¹⁵⁾, denen zu Folge nur beim Säugling durch eine von essentiellen Fettsäuren weitgehend freie Kost Symptome eines Mangels an essentiellen Fettsäuren erzielt werden konnten, würden diese Annahme bestätigen. Beim Erwachsenen sind keine sicheren Mangelerscheinungen bekannt. Hier dürften die vorhandenen Depots an essentiellen Fettsäuren über sehr lange Zeit den an sich geringen Bedarf decken, und das Auftreten von Mangelerscheinungen verhindern. Die Vermehrung der Esterfraktion mit Tri- und Tetraenfettsäuren ist im Rahmen dieser Hypothese als Ausdruck des bei Mangel an essentiellen Fettsäuren bekannten Anstiegs von mehrfach ungesättigten Fettsäuren des Ölsäuretyps zu werten.

Als mögliche Ursachen für den Linolsäuremangel des Neugeborenen stellt Zöllner¹⁰⁾ eine begrenzte Durchlässigkeit der Plazenta für essentielle Fettsäuren sowie die Sonderstellung des Neugeborenenstoffwechsels mit den Kohlenhydraten als überwiegenden Kalorienspendern zur Diskussion. Für eine verminderte Durchlässigkeit der Plazenta für bestimmte Lipotide sprechen die schon erwähnten Befunde von Popjak⁷⁾, Ergebnisse von Johnston und Mitarbeiter¹²⁾, nach denen gewisse ungesättigte Fettsäuren, allerdings mit Transkonfiguration die Plazenta nicht passieren können, wie Ergebnisse von Downing⁵⁾, der beim Schaf erhebliche Unterschiede im Gehalt von verzweigtkettigen Fettsäuren im Depotfett sowie den Fettsäuren und Alpha-Hydroxysäuren im Wollwachs zwischen dem erwachsenen Tier und dem neugeborenen Lamm feststellte. Für die zweite Hypothese sprechen die Ergebnisse von Fairhurst und Waterhouse¹⁶⁾, die über eine Abnahme der Linolsäure in den Cholesterinestern unter einer einseitig kohlenhydratreichen Diät berichten.

In der vorliegenden Arbeit soll über die Zusammensetzung der in den Phosphatiden veresterten Fettsäuren im Serum der Neugeborenen und über die Unterschiede zwischen dem Phosphorlipoid-Gehalt des Serums von Neugeborenen und Erwachsenen, die sich bei chemischen, säulenchromatographischen und gaschromatographischen Untersuchungen ergeben haben, berichtet werden.

METHODIK

Gewinnung des Serums

Bei Erwachsenen erfolgte die Blutentnahme aus der gestauten V. cubitalis. Bei Neugeborenen wurde das Blut kurz nach der Geburt aus der Nabelschnur gewonnen.

Hier ist zu beachten, daß das Blut nicht ausgepreßt wird, sondern langsam austropft. Es wurde sofort zentrifugiert, wenn möglich in der Kälte. Vom abgetrennten Serum wurden 10 ml zur Eiweißfällung nach der Methode von Sperry verwandt.⁹⁾

Extraktion der Serumlipide

In 83 ml Methanol wurden 10 ml Serum tropfenweise unter leichtem Schütteln in einen 250 ml Meßkolben gegeben. Nach Zusatz von 90 ml Chloroform wurde der Chloroform-Methanol-Extrakt in einem Wasserbad von 90° C erhitzt und die Lösung für kurze Zeit zum Sieden gebracht. Nach Abkühlen unter laufendem Wasser wurde der Meßkolben bis zur 250 ml Marke mit Chloroform aufgefüllt und der Inhalt nach gründlichem Mischen in einen Meßzylinder filtriert.

200 ml Filtrat wurden zur weitgehenden Reinigung des Extraktes von nicht-lipoiden Beimengungen mit 40 ml wäßriger 0,02 proz. CaCl_2 -Lösung kräftig durchgeschüttelt. Nach Phasentrennung über Nacht wurde die wässrige Phase, die den größten Teil des Methanols aufgenommen hat, abgetrennt. Als untere Phase erhielt man etwa 140 ml Lipoidextrakt.

Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipoide

Geräte und Reagentien

Zu den Analysen werden Reagentien und Lösungsmittel mit p.a. Reinheitsgrad verwendet.

Petroleumbenzin p.a. 50-70° (Riedel de Haen)

Diäthyläther p.a. (Riedel de Haen)

oder Äther p.a. (Merck)

Methanol p.a. (Merck)

Chloroform p.a. (Merck)

Acetonum p.a. (Merck)

Die Chromatographiesäule wird in enger Anlehnung an die Vorschriften von Hirsch und Ahrens¹⁾, vor allem bezüglich der Dimensionen des Chromatographierohres, aufgebaut. An Stelle des vorgeschriebenen Gerätes mit Metallkanüle dient ein Gerät aus Glas mit 50 ml Reservoir, das in einem Glasrohr mit schräg abgeschnittener Abtropfspitze endet.

Herstellung der Säule: Gemahlene Kieselsäure (Mallinckrodt 100 mesh - Serva, Heidelberg) wurde vor Gebrauch über Nacht bei 120°C im Ofen getrocknet. Die hier benutzte Chromatographiesäule wurde an ihrem unteren konisch zulaufenden Ende mit Glaswolle locker verschlossen. Es empfiehlt sich hier Glaswolle zu benutzen, da z.B. Watte einige Anteile des Lipoidextraktes absorbieren würde,⁵⁾. Die präparierte Kieselsäure wurde in entsprechender Menge (1,1 g für die Trennung der in 2 ml Serum enthaltenen Lipoidmenge) langsam, aber kontinuierlich in das Chromatographierohr (Durchmesser 6 mm, Länge 90 mm) unter gleichzeitigem Beklopfen des

Rohres eingefüllt. Mit 25 ml Chloroform wurde die Säule vor Gebrauch vorgewaschen.

Trennungsvorgang: Von dem erhaltenen Lipoidextrakt (untere Phase) wurden 28 ml eingedampft, dann in 50 ml Chloroform gelöst und auf die Säule gebracht. Es erfolgte eine Eluation in 2 Fraktionen:

Um die Phosphatide von den übrigen Lipoiden zu trennen, wurde die Säule zuerst mit 50 ml Chloroform extrahiert. Auf Grund der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit in der Chloroformphase konnten somit Cholesterinester, freies Cholesterin, neutrale Glyceride und freie Fettsäuren abgetrennt werden.

Anschließend wurden mit 50 ml Methanol die in der Säule verbliebenen Phosphatide eluiert.

Zur Prüfung des Reinheitsgrades der Fraktionen wurden alle Eluate dünnschichtchromatographisch dargestellt.

Dünnschichtchromatographie:

30 g Kieselgel-C (Merck) wurden mit 70 ml Aqua dest. fein verrührt und mit entsprechender Vorrichtung (Desaga-Heidelberg) auf Glasplatten gegossen, die vorher mit Chloroform entfettet waren. Die Platten mit der ange-trockneten Schicht wurden über Nacht im Trockenschrank bei 120°C aufbewahrt. Vor Gebrauch erfolgte eine Vorreinigung der Platten mit einem Acetonvorlauf.

2 ml des Methanol- bzw. Chloroform-Eluats wurden eingengt, in 0,1 ml Chloroform gelöst und hiervon 0,05 ml mit einer Zuckerpipette in einem dünnen ca. 2 cm langen Strich aufgetragen.

Als Lösungsmittel für die Chromatographie wurde ein Gemisch aus 95 ml Petroläther

4 ml Aethylmethyleketon

1 ml Eisessig verwendet.

Nach dem Aufsteigen des Lösungsmittelgemisches über die ganze Platte wurde sie an der Luft getrocknet, mit H_2SO_4 besprüht und für kurze Zeit im Trockenschrank bei $160^\circ C$ aufbewahrt.

Abb. 1 zeigt eine typische Kontrolluntersuchung auf der Dünnschicht.

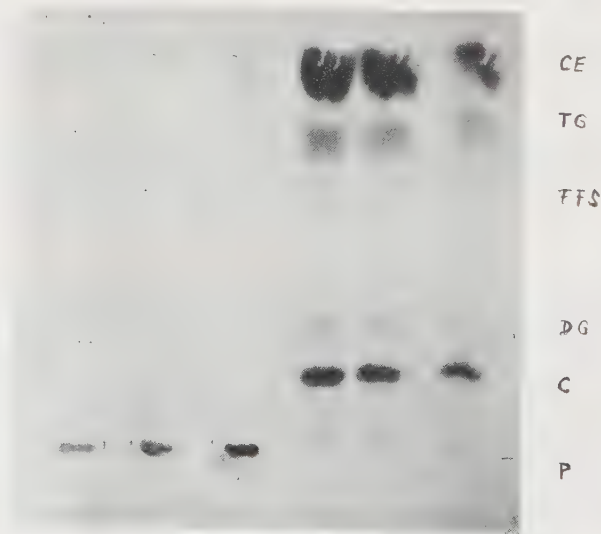


Abb. 1 Dünnschichtchromatogramm der Methanol- und Chloroform-Fraktion aus der Säule (Versuche P_1, P_4, P_F). Die Methanolfractionen enthalten nur Phosphatide, die Chloroformfraktionen nur die restlichen Lipide.
C E = Cholesterinester, T G = Triglyceride,
F F S = freies Fettsäure, D G = Diglyceride,
C = Cholesterin, P = Phosphatide

Gesamt-Phosphatid-Bestimmung

Die Gesamt-Phosphatide wurden unter Entwicklung von Phosphormolybdänblau nach Bartlett²⁾ bestimmt. Die Methode ist eine Modifikation des von Fiske und Subba beschriebenen Verfahrens, erlaubt aber den Nachweis kleinerer Phosphormengen.

Die von Zöllner und Kirsch¹¹⁾ beobachteten Extinktionswerte weichen etwas von den von Bartlett angegebenen ab und betragen bei 830 nm (Zeiss-Spektralphotometer) für 2 µgP in der 1 cm-Küvette 0,200-0,250, abhängig von der Charge des Reduktionsmittels. In der üblichen Fiske-Subbarow-Methode beträgt die maximale Extinktion der gleichen Menge P im gleichen Volumen etwa 25 % davon. Zur Umrechnung auf Phosphatide wird mit dem Faktor 25 multipliziert.

Reagentien:

10 n Schwefelsäure

Wasserstoffperoxyd (30 %)

Ammoniummolybdat 2,5 %, wässrige Lösung

Reduktionsmittel (0,5 g reine α -Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure werden unter mechanischem Rühren zu 200 ml einer frisch bereiteten 15 %igen Natriumbisulfit- (wasserfrei)-Lösung gegeben. Die Lösung filtrieren und in einer dunklen Flasche im Eisschrank aufbewahren.

Wöchentlich frisch zubereiten).

Stammlösung für Eichwert (Standardwert): 219 mg KH_2PO_4 in 500 ml 0,1 n H_2SO_4 lösen (100 µgP/ml)

hiervon Verdünnung 1:50 herstellen (2 µgP/ml) und als Gebrauchslösung verwenden.

Reagenzgläser und Glaswaren werden mit Wasser und Aqua dest. (evtl. mit Bichromatschwefelsäure) extra gewaschen und gespült.

Als Lösungsmittel für die Chromatographie wurde ein Gemisch aus 95 ml Petroläther

4 ml Aethylmethylketon

1 ml Eisessig verwendet.

Nach dem Aufsteigen des Lösungsmittelgemisches über die ganze Platte wurde sie an der Luft getrocknet, mit H_2SO_4 besprüht und für kurze Zeit im Trockenschrank bei $160^\circ C$ aufbewahrt.

Abb. 1 zeigt eine typische Kontrolluntersuchung auf der Dünnschicht.

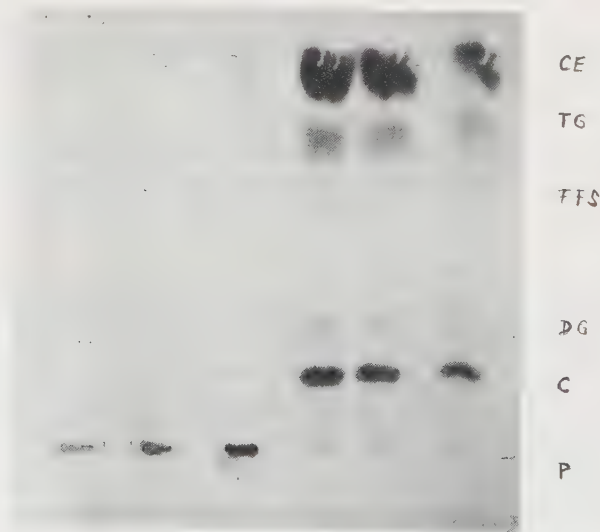


Abb. 1 Dünnschichtchromatogramm der Methanol- und Chloroform-Fraktion aus der Säule (Versuche P_1, P_4, P_F). Die Methanolfractionen enthalten nur Phosphatide, die Chloroformfraktionen nur die restlichen Lipide.
C E = Cholesterinester, T G = Triglyceride,
F F S = freies Fettsäure, D G = Diglyceride,
C = Cholesterin, P = Phosphatide

Gesamt-Phosphatid-Bestimmung

Die Gesamt-Phosphatide wurden unter Entwicklung von Phosphormolybdänblau nach Bartlett²⁾ bestimmt. Die Methode ist eine Modifikation des von Fiske und Subba beschriebenen Verfahrens, erlaubt aber den Nachweis kleinerer Phosphormengen.

Die von Zöllner und Kirsch¹¹⁾ beobachteten Extinktionswerte weichen etwas von den von Bartlett angegebenen ab und betragen bei 830 nm (Zeiss-Spektralphotometer) für 2 μgP in der 1 cm-Küvette 0,200-0,250, abhängig von der Charge des Reduktionsmittels. In der üblichen Fiske-Subbarow-Methode beträgt die maximale Extinktion der gleichen Menge P im gleichen Volumen etwa 25 % davon. Zur Umrechnung auf Phosphatide wird mit dem Faktor 25 multipliziert.

Reagentien:

10 n Schwefelsäure

Wasserstoffperoxyd (30 %)

Ammoniummolybdat 2,5 %, wässrige Lösung

Reduktionsmittel (0,5 g reine α -Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure werden unter mechanischem Rühren zu 200 ml einer frisch bereiteten 15 %igen Natriumbisulfit- (wasserfrei)-Lösung gegeben. Die Lösung filtrieren und in einer dunklen Flasche im Eisschrank aufbewahren.

Wöchentlich frisch zubereiten).

Stammlösung für Eichwert (Standardwert): 219 mg KH_2PO_4 in 500 ml 0,1 n H_2SO_4 lösen (100 $\mu\text{gP/ml}$)

hiervon Verdünnung 1:50 herstellen (2 $\mu\text{gP/ml}$) und als Gebrauchslösung verwenden.

Reagenzgläser und Glaswaren werden mit Wasser und Aqua dest. (evtl. mit Bichromatschwefelsäure) extra gewaschen und gespült.

Ausführung:

Eine etwa 2 μgP entsprechende Menge (Phosphatid (Einsatz 0,5 ml der Methanolfraction aus der Säule bzw. ¹/₂₅ der unteren Phase eines Lipoidextraktes von 2 ml Serum) wird mit 0,5 ml 10 n H_2SO_4 versetzt und 4 Stunden bei 160° (mit Silberfolie leicht abdecken, um Verschmutzung zu vermeiden) verascht. Nach Abkühlen fügt man 2 Tropfen H_2SO_4 zu und verascht nochmals 2 Stunden bei 160° . Die Lösung muß jetzt farblos sein, sonst nochmals 1 Tropfen H_2O_2 in alle Gläser geben und nochmals veraschen.

Farbreaktion: Der Rückstand nach dem Veraschen beträgt 0,2 ml. Dazu fügt man 4,2 ml Aqua bidest., 0,4 ml Ammoniummolybdatlösung und nach Schütteln, 0,2 ml Reduktionsmittel. Anschließend wird erneut geschüttelt.

Nun werden alle Gläser in einem kochenden Wasserbad (um Verdunstung zu vermeiden, auf alle Gläser Glaschusser) 7 Min. gekocht und in kaltem Wasserbad abgekühlt.

Der Ansatz des Eichwertes besteht aus 1 ml Standardlösung (2 $\mu\text{gP}/\text{ml}$) und wird genauso behandelt wie die übrigen Proben.

Beim Leerwert werden zu Beginn der Analyse nur 0,5 ml 10 n H_2SO_4 zupipettiert.

Die Extinktionswerte wurden in Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 830 μm und einer Schichtdicke von 1 cm gegen Wasser abgelesen.

Die Leerwerte sollen 0,020 bis höchstens 0,030 nicht überschreiten und sind von der Extinktion für Eichwert und unbekannte Proben abzuziehen.

Die Extinktion des Eichwertes von 2 µgP beträgt 0,220 bis 0,270.

Vor dem Ablesen der Proben muß der Küvettenvergleich durchgeführt und eine evtl. Differenz von dem Extinktionswert der Proben abgezogen werden.

Berechnung:

Nach Ermittlung des Extinktionsmittelwertes der 2 bzw. 3 Phosphatid-Standard-Proben sowie der 3 Serum-Extrakt-Proben berechnet man mittels eines Dreisatzes die Menge P pro Ansatz.

Die Konzentrationen von Lipoid-Phosphor bzw. Phosphatid im Serum ergeben sich dann aus folgenden Formeln:

$$\text{mg \% Phosphatid-Phosphor} = \frac{\text{Ansatz (untere Phase)} \cdot 5 \cdot 100}{\text{eingesetzte Menge} \cdot 4 \cdot 1000}$$

$$\text{mg \% Phosphatid} = \text{Phosphatid-Phosphor mg \%} \cdot 25$$

Umesterung der Phosphatid-Fettsäuren für die Gaschromatographie:

Die etwa 6 mg Phosphatid enthaltende Lipoidprobe (Methanolfraktion) wird in Schliffzentrifugenröhrchen zum Trocknen eingedampft und mit 1,5 ml Methanol-Schwefelsäure (1 ml konz. Schwefelsäure vorsichtig in 30 ml Methanol eintropfen) 60-90 Min. unter Rückfluß gekocht.

Halgren und Mitarbeiter empfehlen 2stündiges Kochen mit 5 % Schwefelsäure enthaltendem Methanol, um die Sphingomyelin-Fettsäuren vollständiger in die Methylester überzuführen.

Nach dem Abkühlen fügt man 0,5 ml H_2O und 1 ml Äther-Petroläther (1:1) hinzu, mischt 1 min lang intensiv mit dem Magnetrührer in N_2 -Atmosphäre und läßt die Phasen absetzen (evtl. zentrifugieren). Die obere Phase wird vorsichtig und ohne Verlust mit einer Lösungsmittelpipette nach Eberhagen⁽⁵⁾ abgezogen und in ein Zentrifugenglas übergeführt. Die Rohrwandungen des 1. Röhrchens werden 2 bis 3 mal mit je 0,5 ml Äther-Petroläther gewaschen und die obere Schicht jedes Mal durch Absaugen in das 2. Röhrchen gebracht.

Die gesammelten Äther-Petroläther-Extrakte werden mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen (Magnetrührertechnik, Indikatorpapier) und über einer Spatelspitze wasserfreien Natriumsulfats über Nacht im Eisschrank getrocknet und dann zentrifugiert. Der Überstand wird unter Nachspülen mit Äther in ein neues Schliffzentrifugenglas pipettiert und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 0,1-0,2 ml $CHCl_3$ gelöst und zur Gaschromatographie verwendet.

Gaschromatographie:

Die gaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester vor und nach Hydrogenierung wurde an einem Gerät der Firma Packard Instrument (Modell 800) durchgeführt. Die Säulenfüllung bestand aus: Bernsteinsäure-ethylenglykolester auf Chromosorb als Tragermaterial,

bei einer Säulenabmessung von $1,80 \text{ cm} \cdot 0,4 \text{ cm}$.

Die Temperatur des Einspritzblocks lag bei 280° , die der Säule bei 196° und die des Detectors bei 215° .

Als Trägergas fand Argon mit einer Durchflußrate von 60 cm/min bei einem Druck von $2,2 \text{ mg cm}^2$ Verwendung.

Der Argondetector stand unter einer Spannung von 500 V . Elektrometer ($3 \cdot 10^{-8} \text{ A}$).

Ergebnisse und Diskussion

Die in 15 Seren von Neugeborenen ermittelten Werte für Gesamtphosphatide sind gegenüber den Werten bei Erwachsenen stark erniedrigt und liegen im Mittel bei 90 mg% (Tabelle 1). Die Serumkonzentrationen für Gesamtphosphatide beim Erwachsenen konnten nur in fünf Fällen bestimmt werden; diese fünf Analysen zeigen jedoch mit den zum Vergleich herangezogenen Angaben aus der Literatur eine gute Übereinstimmung.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der in den Phosphatiden veresterten Fettsäuren beim Neugeborenen und Erwachsenen wurde einer eingehenden statistischen Analyse unterzogen (Tabelle 2 und 3). Im einzelnen wurden unter der Annahme, daß die Stichproben normal verteilt sind, folgende Parameter berechnet:

1. Arithmetischer Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n}$$

2. Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3. Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes:

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s}{n}}$$

Wegen der geringen Stichprobenumfänge wurde die Student- oder T-Verteilung zur Ermittlung der Vertrauensgrenzen benutzt.

Die statistische Sicherung der Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erfolgte durch einen Vergleich der Mittelwertdifferenzen auf Signifikanz. Wegen der kleinen Stichprobenumfänge ($N_1 + N_2$ kleiner als 30) bot sich die gemeinsame Streuung als bestmöglicher Schätzwert für die Standardabweichung der Gesamtpopulation an.

Der Signifikanztest erfolgte dann nach der Formel:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s_{12} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

(Division der Mittelwertdifferenz durch die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz unter der Annahme normal verteilter Populationen). Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurden die Geigy-Tabellen benutzt (Studentverteilung). Das Ergebnis der Signifikanzteste ist in Tabelle 4 wiedergegeben. Folgende Mittelwertdifferenzen sind als "signifikant"

($0,01 < p < 0,05$) oder "eindeutig signifikant" ($p < 0,01$) gesichert:

C _{14:0}	$p < 0,005$
C _{16:0}	$p < 0,05$
C _{18:0}	$p < 0,02$
C _{18:2}	$p < 0,001$
C _{20:0}	$p < 0,05$
C _{22:0}	$p < 0,05$

Der Schluß auf in den Grundgesamtheiten tatsächlich nicht vorhandene Unterschiede ist nicht zulässig, da

diese tatsächlich vorhanden sein könnten, aber infolge zu geringer Stichprobenumfänge und (oder) zu großer Streuungen nur nicht nachgewiesen werden konnten. Der in Tabelle 4 benutzt Begriff "O-Hypothese nicht abweisbar" bedeutet, daß im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen keine mit statistischen Überprüfungsverfahren nachweisbaren "signifikanten" oder "eindeutig signifikanten" Mittelwertdifferenzen nachgewiesen werden konnten.

Die errechneten Mittelwerte der in den Phosphatiden des Erwachsenen veresterten Fettsäuren stimmen mit den Angaben in der Literatur gut überein (Tabelle 5).

Die niedrigen Werte für Gesamtphosphatide beim Neugeborenen, sie betragen kaum die Hälfte des Erwachsenenwertes, standen nach den Analysen von Zöllner und Wolfram,¹³⁾ die in ihren Cholesterinwerten beim Neugeborenen nur ein Drittel des Erwachsenenwertes fanden, zu erwarten. Aufgrund der für die Verteilung der Fettsäuren in den Phosphatiden des Neugeborenen ermittelten Werte (Tabelle 2) ist die allgemein als Kriterium für einen Mangel an essentiellen Fettsäuren geltende Verminderung von Arachidonsäure ($C_{20:4}$) bzw. Vermehrung der dreifach ungesättigten Fettsäure mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen Holmann (14) in den Fettsäuren der Phosphatide des Neugeborenen-Serums nicht nachzuweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Serumphosphatide des Neugeborenen wurden nach Extraktion von den übrigen Lipoiden mittels Säulenchromatographie isoliert und ihre Fettsäuren als Methyl ester gaschromatographisch aufgetrennt. Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Auswertung der Chromatogramme wurden tabellarisch erfaßt und statistisch gesichert.

Die Gesamtposphatidwerte bei den Neugeborenen erreichen kaum die Hälfte der Werte bei den Erwachsenen. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der in den Phosphatiden veresterten Fettsäuren konnte nur bei den Fettsäuren

$C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:2}$, $C_{20:0}$, $C_{22:0}$

gefunden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Hirsch J. and E.H. Ahrens, jun. The separation of complex lipid mixtures by the use of silicic acid chromatography
J. biol. chem. 233, 311 (1958)
- 2) Bartlett, G.R. Phosphorus Assay in Column Chromatography J. biol. chem. 234, 466 (1959)
- 3) Downing, D.T. Branched-Chain Fatty Acids in Lipids of the Newly Born Lamb
J. Lip. Research 5, 210 (1964)
- 4) Fuhrmann, W. Untersuchungen über die Fettsäuren der Plasmalipide bei erbbedingter kohlenhydratsensitiver Hyperlipämie
Dtsch. Med. Wochr. 89, 1293 (1964)
- 5) Eberhagen, D. Chemie-Ingenieur-Technik - "Pipette für niedrig-siedende Lösungsmittel" Zeitschrift für technische Chemie, Verfahrenstechnik und Apparatewesen 8 35, 590 (1963)
- 6) Popjak, G. The Origin of Fetal Lipids Cold Spring Harbor Symposia on Qualitative Biology, (1954)
- 7) Popjak, G. Synthesis of Phosphorlipids in the Foetus. Belt Memorial Fellow for Medical Research St. Thomas's Hospital Medical School, London Reprinted from NATURE Vol. 160 page 13, (1947)
- 8) Schrade, W., E. Böhle, R. Biegler, R. Teicke, B. Ullrich Gaschromatographische Untersuchungen der Serumfettsäuren des Menschen.
Klin. Wochr. 38, 739 (1960)
- 9) Sperry, W.M. Lipid Analysis in "Methods of Biochemical Analysis"
Vol. 2 p. 83
London/New York
Interscience Publisher 1955
- 10) Zöllner, N. Die Cholesterinester des Plasmas
Dtsch.med.Wochr. 89, 731 (1964)
- 11) Zöllner, N. und K. Kirsch: Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipide,
Z.ges.exp.Med. 134, 10-28 (1960)

- 12) Johnston, P.V. and
Kummerow, F.A.
Non - Transfer of Trans Fatty-
Acids from mother to Young
Proc. soc. exp. biol. Med.
New York 96,760 (1957)
- 13) Zöllner, N. und
Wolfram, G.
Dünnschichtchromatographische
Systeme zur Trennung der Plasma-
lipoide
Klin. Wochr. 40, 1101 (1962)
- 14) Holman R.T.
Caster W.O. and
Wiese H.F.
The essential Fatty Acids
requirements of Infants and the
assessment of their dietary
intake of Linoleate by Serum
Fatty Acid Analysis
Amer. J.Clin.Nutr. 14,71 (1964)
- 15) Hansen, A.E. and
Mitarb.
Role of linoleic acid in infant
nutrition,
Pediatrics 31,171 (1963)
- 16) B.H.J. Fairhurst and
Waterhouse C.
Effect of Previous Dietary Intake
on the Fatty Acid Composition of
the Plasma Cholesterol Esters
Amer. J. of Clin.Nutr.
13, 92 (1963).

Tabelle 1 Phosphatidkonzentrationen im Plasma
Neugeborener und Erwachsener, bestimmt
aus dem Lipoidextrakt nach Sperry und
nach zusätzlicher säulenchromatogra-
phischer Trennung

Gesamtwerte: Phosphatide in mg%

	Versuch	Sperryphosphatide mg%	Säulenphos- phatide mg%	Recovery %
A. Neugeborene:	1	64,3	64,0	99,5
	2	89,3	87,6	98,1
	3	90,0	87,6	96,7
	4	86,6	86,6	100
	5	92,3	86,0	93,2
	6	75,7	72,6	95,9
	7	86,5	86,0	99,4
	8	88,2	88,2	100,0
	9	90,0	91,7	101,9
	10	88,2	88,6	100,5
	11	115,0	117,0	101,7
	12	79,0	79,0	100
	13	101,0	97,4	96,4
	14	102,0	103,0	101
	15	96,1	97,2	101,1
	16	102,0	102,0	99,0
		1446,2	1433,5	1584,4
	M	90,38	89,59	99,02
B. Erwachsene:	PE	218	215	
	PW	238	221	
	PL	271	268	
	PB	216	215	
	PF	195	192	
		1138	1111	
	M	227,6	222,2	

Tabelle 2. Die Fettsäuren der Phosphatide im Serum Neugeborener. Die Fraktionen XI, X₂ sowie a bis f konnten nicht identifiziert werden.

	14:0	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4	22:0	XI	X ₂	a	b	c	d	e	f
P/51	0,936	14,720	2,95	0,57	18,85	14,84	9,12	0,475	6,47	20,90		0,333							
P/5	0,362	25,5	1,9	0,54	15,2	12,6	6,69	0,705	10,20	16,82									
P/4	0,687	22,95	2,56	0,379	19,25	14,29	8,63	0,625	+	17,05	0,675								
P/31	0,686	14,1	2,06		18,3	13,75	6,8	+	3,30	15,70									
P/5	0,614	25,0	2,64	+	15,0	14,0	6,76	0,422	8,41	15,55			1,152			2,36	3,22		4,8
P/1	0,534	16,15	1,48	0,368	18,35	14,8	8,55	1,103	4,27	22,3	0,505	0,061		0,428			2,250	3,550	3,1
P/2	0,675	25,4	0,708		12,53	8,5	5,77		3,15	15,40			0,195			0,412	1,380	2,140	2,38
P/4	0,720	28,0	2,57	0,428	14,8	11,9	8,75	0,892	4,32	16,25			0,617			2,060	2,890		6,08
P/3	0,776	31,05	2,155	0,259	15,85	10,0	5,59	0,970	5,10	15,85		0,126					1,617	2,155	4,42
P/D	0,865	33,70	1,120		16,65	12,6	6,48	0,980	5,55	12,95	0,253		1,555			0,450	1,010	3,640	4,82
P/I	0,768	32,0	1,830	0,345	17,8	6,6	8,05	6,90	5,10	13,80	1,300	0,212	0,500	0,385	1,080	0,484	1,55	0,235	4,25
P/5	0,441	39,321	2,227	0,348	13,107	8,351	6,333	9,626	4,872	13,919	0,206	0,747	0,186	0,575	+	0,413	2,480	2,041	3,712
B/4	0,080	32,4	1,550		15,0	11,5	8,12	1,040	6,40	17,40	0,710	0,289	0,450	+	+	0,610	1,980	2,600	3,83
P/F	1,040	34,5	1,270		13,1	12,8	1,170	1,170	5,0	13,70	1,820			0,460	+	2,600	3,320	5,520	5,59
Σ	10,186	400,791	27,020	3,237	223,787	166,53	101,10	15,913	72,22	227,59	5,469	1,768	4,985	1,848		9,389	21,617	21,881	42,982
X ₂	0,728	28,628	1,930	0,405	15,985	11,90	7,22	1,326	5,56	16,86	0,781	0,295	0,623	0,462		1,174	2,162	2,735	4,298
Σ	0,208	7,610	0,647	0,104	2,255	2,608	1,346	1,773	1,967	2,646	0,585	0,243	0,486	0,082		0,979	0,733	1,544	1,109
Σ _w	0,056	2,034	0,173	0,037	0,603	0,697	0,360	0,512	0,546	0,707	0,221	0,099	0,172	0,041		0,346	0,232	0,546	0,351

Tabellie 3 Die Fettsäuren der Phosphatide im Serum Erwachsener. Die Fraktionen a bis g konnten nicht identifiziert werden.

	14:0	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	20:3	20:4	20:5	a	b	c	d	e	f	g
P/B	1,003	10,529	2,794	0,716	18,828	15,924	22,677	0,806	2,418	3,510	12,610		0,860	1,827	3,941	5,589	2,579		
P/L	0,79	26,9	1,56	0,39	13,1	12,8	21,6	0,78	0,26	2,2	8,7		1,12	0,272	0,23	1,25	3,37	2,75	0,827
P/P	1,12	2,14	0,206	2,8	1,1	1,84	1,39	3,5	1,54	7,8	28,5	6,4	5,3	2,56	0,56	3,76	13,1	12,0	4,46
P/W	1,2	34,5	2,05	0,385	3,64	16,2	21,2	0,94	-	2,05	4,6		1,38	0,276	0,04	2,90	3,24	1,32	
P/B	1,242	16,22	0,963	0,027	18,292	15,412	22,909	1,553	-	2,964	7,678	1,270	1,270	0,804	1,298	2,879	1,807	1,496	
Σ			4,318	49,960	62,170	89,776	7,579	4,218	18,524	62,088	7,670	9,930	5,289	7,069	16,398	24,096	17,566	5,287	
$\bar{x}$	1,071	18,058	1,515	0,864	9,992	12,435	17,955	1,316	1,406	3,704	12,418	3,835	1,986	1,166	1,414	3,280	4,819	4,392	2,644
s	0,182	12,864	0,993	1,110	7,292	6,075	9,288	1,153	1,085	2,366	9,435	3,627	1,863	1,044	1,472	1,577	4,671	5,112	2,569
$s_{\bar{x}}$	0,081	55,753	0,444	0,496	3,261	2,717	4,154	0,516	0,889	1,058	4,219	2,565	0,83	0,467	0,658	0,704	2,089	2,556	1,817

Tabelle 4

Signifikanzteste

14:0	$P < 0,005$	eindeutig signifikante Differenz
16:0	$P < 0,05$	signifikante Differenz
16:1	$0,30 > P > 0,20$	Nullhypothese nicht abweisbar
16:2	$0,30 > P > 0,20$	Nullhypothese nicht abweisbar
18:0	$P < 0,02$	Signifikante Diff.
18:1	$0,80 > P > 0,70$	Nullhypothese nicht abweisbar
18:2	$P < 0,001$	eindeutig signifikante Differenz
18:3	$0,90 > P > 0,80$	Nullhypothese nicht abweisbar
20:3	$0,20 > P > 0,10$	Nullhypothese nicht abweisbar
20:4	$0,20 > P > 0,10$	Nullhypothese nicht abweisbar
20:0	$P < 0,05$	signifikante Diff.
22:0	$P < 0,05$	signifikante Diff.

Tabelle 5 Die Fettsäureverteilung in den Phosphatiden
in Arbeiten anderer Autoren und den eigenen
Analysen. M = Mittelwert, $\pm = \frac{S}{N}$

		Schrade ⁸⁾	Fuhrmann ⁴⁾	Erwachsene	Neugeborene
14:0		0	1,9	1,07 0,08	0,73 0,056
16:0	M	30,78	28,3	18,05	28,63
	$\pm$	1,05		5,75	2,01
16:1	M	3,36	1,8	1,52	1,93
	$\pm$	0,42		0,44	0,77
16:2	M			8,64	0,+
	$\pm$			0,49	0,03
17:0	M				1,93
	$\pm$				
18:0	M	12,0	14,0	9,99	15,98
	$\pm$	0,69		3,26	0,6
18:1	M	15,1	13,8	12,43	11,90
	$\pm$	0,43		2,71	0,69
18:2	M	20,8	22,4	17,95	7,22
	$\pm$	0,53		4,15	0,36
18:3	M		0,7	1,52	1,33
	$\pm$	1,23		0,516	0,51
20:3	M	0,03	3,2	3,7	5,56
	$\pm$			1,05	0,54
20:4	M	8,78	11,2	12,42	16,26
	$\pm$	0,44		4,05	0,7
22:0	M			3,835	0,78
	$\pm$				0,22

L e b e n s l a u f

Ich, Chidebelu Lawrence E z e , wurde am 30. November 1933 als Sohn des Tischlers Chief Abraham Eze und seiner Ehefrau Sarah geb. Chiboke in Umuaga in Nigeria geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Abraka, Umuabi, Asaba und Ekwulawbia. 1945 machte ich die Volksschul-Abschlußprüfung in Ekwulawbia. In den Jahren 1949 bis 1953 besuchte ich das Warri-College und die St. Augustines (Anglican) Grammar School Nkwerre, wo ich 1953 das Reifezeugnis (Cambridge School Certificate) erhielt.

1956 begann ich an der Medizinischen Fakultät der Friedrich Alexander Universität in Erlangen mein medizinisches Studium. Dort schloß ich 1959 mit dem Physikum ab und fing in München 1960 mit der klinischen Zeit an. Im Jahre 1963 absolvierte ich mein Staatsexamen in München und 1964 nach dem Diplom für Tropenmedizin und Hygiene kehrte ich nach Nigeria zurück.

Abschließend möchte ich hiermit meinen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Nepomuk ZÖLLNER aussprechen, der mir die Möglichkeit verschaffte, in seinem Labor das vorliegende Thema zu bearbeiten.

Herr Dr. G. WOLFRAM war mir in der technischen Durchführung eine fördernde Hilfe, für die ich ihm danke.

Fräulein K. KIRSCH möchte ich ebenfalls für ihre Hilfe meinen Dank aussprechen.

